Istituto di Patologia Medica Dimostrativa
della R. Università di Catania, diretto dal prof. Maurizio Ascoli

Sul valore clinico della sieroreazione di Wright

Dott. Luigi Ferro

Estratto della "Riforma Medica", Anno XXX, N. 7.

NAPOLI
TIPOGRAFIA DELLA « RIFORMA MEDICA »

1914

*Istituto di Patologia Medica Dimostrativa
della R. Università di Catania, diretto dal prof. Maurizio Ascoli*

Sul valore clinico della sieroreazione di Wright

Dott. Luigi Ferro

Estratto della "Riforma Medica", Anno XXX, N. 7.

NAPOLI
TIPOGRAFIA DELLA « RIFORMA MEDICA »

1914

Sino al 1910 la sieroreazione per la febbre mediterranea, dopo un lungo periodo di discussioni felicemente superate era universalmente giudicata quale prova sicura per una diagnosi di certezza di infezione melitense in atto o pregressa.

A questo si era addivenuti dopo che le ricerche numerose di una lunga serie di autori avevano potuto dimostrare sia la sua specificità che l'alta percentuale di risultati positivi in individui sicuramente affetti da infezione melitense. E la clinica si era e si è potuta avvantaggiare di questa reazione per studiare, e definire spesso, una sindrome così complessa e proteiforme quale è capace di suscitare nell'individuo la presenza in circolo del micrococco di Bruce.

Sino ai lavori di Nègre tutti gli autori ritenevano come di indubbia origine una malattia a carattere infettivo in cui il siero dell' ammalato desse, a contatto del micrococco di Bruce, agglutinazione positiva nelle diluizioni di 1:50, 1:100 o più forti.

Il Nègre invece e successivamente Saissawa, Anglada, Rouslacroix ed altri, discutendo sul valore probativo della siero-agglutinazione pel micrococco di Bruce giunsero a risul-

tati alquanto diversi, affermando che sieri di individui certamente indenni da infezione melitense erano capaci di agglutinare i ceppi presi in esame, nelle diluizioni 1:30, 1:50, 1:100, 1:200, e qualche volta in diluizioni ancora maggiori.

Successivamente Nègre e Raynaud ritennero (come del resto aveva precedentemente sostenuto nel suo primo lavoro il Nègre stesso) che l' agglutinazione non specifica venisse in totalità eliminata riscaldando il siero per mezz' ora a 56°, ricerche che trovarono conferma in quelle di Saissawa, Carrieu e Anglada, Menini, Nicolle e Conor, ed altri.

Dai lavori di Nègre e Raynaud e così pure da quello di Saissawa, risulta un fatto importante per la portata delle loro osservazioni.

Questi autori affermano che mentre alcuni ceppi si lasciano agglutinare facilmente da sieri indenni, altri fra questi ceppi esaminati non sono affatto agglutinati da sieri non specifici. Ora ciò lascia adito alla supposizione che non tutti i ceppi possano fornire risultati probativi a scopo diagnostico, e che i diversi ceppi presentino un diverso grado di agglutinabilità non specifica : come è del resto noto per altri germi. Da questo punto ho preso le mosse per le mie ricerche : appurare se è vero che non tutti i ceppi di micrococco di Bruce possono servire per la siero-agglutinazione e se le modificazioni proposte da Nègre e Raynaud eliminano le agglutinine non specifiche.

Successivamente, e man mano che il lavoro procedeva, ho allargato il campo delle indagini ed ho preso in esame sia la questione dell' uso dei germi morti, sia la recente ed interessante discussione sull' esistenza di un micrococco così detto paramelitense.

I. Tecnica. — La tecnica da me seguita fu quella macroscopica.

Le osservazioni di Euzier e Roger e di Rouslacroix sui lavori di Nègre e Raynaud mi hanno indotto a darle la preferenza su quella microscopica.

L' agglutinazione macroscopica è del resto quella in uso da tempo nel nostro laboratorio.

I sieri in esame, ottenuti per centrifugazione del coagulo lasciato per due ore in termostato a 37° venivano diluiti con soluzione cloro-sodica (0,85 %) nelle proporzioni stabilite (dall' 1/10 all' 1/6000). Un cmc. di ciascuna diluizione era posto in una provettina di 7 cm. di lunghezza e ½ centimetro di diametro interno e veniva addizionato di una quantità, eguale in tutte le provette, di emulsione batterica sufficiente per dare in unione con un cmc. di soluzione fisiologica un liquido discretamente torbido.

Le culture nel maggior numero dei casi, tranne nelle esperienze in cui ho voluto studiare l' influenza delle diverse età delle culture sull' agglutinabilità specifica e non specifica, furono sempre di 24-36 ore.

Per preparare l' emulsione batterica la patina culturale di ogni tubo di agar comune, veniva emulsionata con cura in 2,5 cmc. di soluzione fisiologica: l' emulsione ottenuta da un tubo di cultura era sufficiente per una diecina di prove.

Nelle esperienze seriali, nelle quali era duopo stabilire un maggior numero di prove, le diverse emulsioni ottenute da ciascun tubo venivano, prima di distribuirle, mescolate in una sola provetta. La distribuzione dell' emulsione batterica era fatta a goccie con pipetta di Pasteur munita di cappuccio di gomma: la quantità di emulsione batterica aggiunta era di 15-20 gocce a seconda della densità dell' emulsione.

Dopo l' aggiunta dell' emulsione batterica le prove venivano agitate; la lettura seguiva dopo che le prove erano state per due ore a 37° e 24 ore a temperatura ambiente.

Solo in casi speciali le prove venivano osservate dopo diverso periodo di tempo : 2, 6, 12, 24 ore.

In tutte le prove da me istituite per ogni tubo o somma di tubi di cultura e per ogni ceppo ho sempre posto una prova di controllo con sola soluzione fisiologica più emulsione batterica. Solo quando questa prova si presentava omogeneamente torbida e senza sedimento notevole ho dato valore ai risultati dell'esperienza.

II. Diversità di comportamento dei diversi ceppi esamimati.—I ceppi presi in esame furono sette, contrassegnati : M III ; M VI ; M VII (Nicolle); M VIII; M. Zammit (originale); M. Ferrarotto I (isolato nell' Istituto) ; M. Tr.

Come caratteri culturali i diversi ceppi presi in esame non differiscono notevolmentre fra loro, presentando ben nette le singole particolarità caratteristiche per il micrococco di Bruce.

Solo il ceppo Tr. presenta uno sviluppo più rigoglioso degli altri ; mentre infatti gli altri ceppi danno in 24 ore una lieve patina non omogenea nella quale ancora si possono distinguere con l' uso della lente le singole colonie, il ceppo Tr. in ugual periodo di tempo dà una bella patina omogenea e abbastanza spessa. (Rilevo qui incidentalmente che i caratteri culturali del ceppo Tr. non differiscono notevolmente da quelli offerti dal ceppo paramelitense favoritici dal prof. Nicolle). Per i caratteri microscopici, le diverse culture da noi possedute non differiscono fra di loro : come pure identici sono i risultati forniti dall' esame microscopico di preparati allestiti con culture in brodo.

Ho cimentati i diversi ceppi con 118 sieri sia di individui sani, che di individui affetti da svariate forme morbose febbrili e non febbrili, nonchè con sieri di individui affetti da infezione melitense comprovata nel maggior numero dei casi dai sintomi cli-

nici e dal decorso della malattia, in alcuni casi anche dall' esame culturale.

In queste ricerche ho cercato di stabilire il titolo della diluizione del siero in esame che poteva servire come valore limite per una diagnosi positiva.

Le opinioni degli autori sono a questo proposito assai discordi: così mentre Wright considerava la diluizione 1:30-1:50 come tasso minimo per una sierodiagnosi probativa, e Guthrie abbassava questo titolo all'1:20-1:10; Nègre e Raynaud, Saissawa, Anglada prendono come tale la diluizione di 1:500-1:1000, Mézy e Mazel, Weill e Menard quella dell'1:1200-1:1700.

Fra questi estremi troviamo Gardon (1:100); Rouslacroix (1:200); Manquaut e Pégurier (1:200); Danlos, Wurtz e Tanon (1:300); Sicard e Lucas (1:250); Agasse-Laffont e Weill (1:100).

Dalle mie ricerche risulta che i diversi ceppi si comportano assai differentemente di fronte ai sieri normali. Infatti mentre taluni ceppi non si lasciano agglutinare neppure con le diluizioni del siero 1:10, 1:20, altri danno agglutinazione nettamente positiva o quasi completa con la diluizione all'1:50.

Il ceppo Tr. fornisce poi agglutinazioni nettamente positive a diluizioni molto più forti: 1:100, 200, 400 con tutti i sieri sia immuni che non.

Ho voluto ripetere le stesse esperienze con culture più vecchie, di 48, 96 ore e persino con culture di 15-20-45 giorni per vedere se, come alcuni autori affermano, lo stesso ceppo non presentasse un diverso comportamento a seconda dell'età delle culture. Ottenni in tutte le prove risultati identici, il che non concorre a crescere importanza al contrasto che su questo punto verte fra i diversi autori (Nègre 4-5 giorni; Lotti 8-24 ore, ecc.).

Ho pure studiato il comportamento di fronte a sieri specifici, normali e non specifici, di germi cre-

sciuti su terreni alcalinizzati in grado diverso e neutri, essendo noto come la reazione del mezzo culturale possa influire sull'agglutinabilità di numerosi batteri : (tifo, meningococco, colera, ecc.).

Dai risultati sono portato a concludere come nessuna modificazione notevole derivi nei riguardi dell'agglutinazione, dalle modificazioni della reazione del mezzo nutritizio usato (senza però replicati passaggi sullo stesso), ove com'io feci, si rimanga nei limiti compatibili con le variazioni che può subire l'intensità della reazione dei comuni terreni culturali nella preparazione di essi.

Nota. Nell'allestimento di prove di siero agglutinazione pel micrococco melitense va sempre tenuta presente un'eventualità non frequente a riscontrarsi : il fenomeno dell' agglutinazione paradossa, già da tempo noto per altri germi.

Sieri che non agglutinano, qualche ceppo, nelle diluizioni di 1:25, 1:50, danno agglutinazione netta nelle diluizioni di 1:100, 200, 400 e a volte a titoli più alti ancora. Per evitare possibili errori bisogna non limitare la ricerca di agglutinine specifiche alle basse diluizioni dei sieri ma oltrepassarle raggiungendo l'1:400.

III. Azione del riscaldamento sul siero. — Carrieu e Anglada, che assegnano un forte valore diagnostico ai risultati positivi ottenuti col procedimento dettato da Nègre e Raynaud, riportano che in una prima serie di prove hanno potuto notare come lo scaldamento del siero facesse qualche volta sparire oltre alle agglutinine non specifiche, quelle specifiche e che su 90 sieri non specifici l'agglutinazione si aveva ancora in cinque, dopo il riscaldamento.

Ho istituito, con una serie di 52 sieri (di cui 6 appartenenti a individui affetti da melitococcia, 5

sieri normali; il resto appartenenti ad individui affetti da svariate forme morbose, in gran parte febbricitanti) delle esperienze in parallelo con la tecnica dettata da Nègre e Raynaud e la comune: l'azione del riscaldamento sulle agglutinine del siero non mi è risultato così netta come si vuole da Nègre e da altri.

Qualche volta il titolo del siero, scaldato per mezz'ora a 56°, si abbassa da 1:20, 1:40, rispettivamente a 1:10, 1:20; e ciò per i sieri non specifici. Quanto a quelli specifici il riscaldamento determina quasi costantemente una lieve diminuzione del loro potere agglutinante, diminuzione che talvolta può giungere a gradi notevoli: da 1:320 a 1:80 — da 1:1280 a 1:360.

Degno di rilivo è poi il fatto che quando ci si trovi in presenza di un ceppo facilmente agglutinabile con diluizioni abbastanza forti da quasi tutti i sieri normali, come il ceppo Tr., il riscaldamento per mezz'ora a 56° influisce solo in grado minimo sulle cosidette agglutinine non specifiche.

Non sembra quindi che il riscaldamento porti notevoli vantaggi nella prova siero-diagnostica, poichè non offre notevole vantaggio nella differenziazione dei sieri specifici.

IV. Uso di germi uccisi.—La questione è stata da lungo tempo sollevata per il pericolo che offre il maneggio di germi vivi; e di fronte alle facili infezioni di laboratorio pel micrococco di Bruce era naturale si cercasse di evitare il pericolo sempre presente. A questo riguardo Izar applicò alla reazione l'uso di emulsioni bacillari fenolizzate e sterilizzate col riscaldamento, in luogo di germi vivi, e ne ottenne buoni risultati.

Recentemente Ronchèse propose invece l'uso di germi uccisi col formolo.

Tutti e due gli autori sono concordi nell'affer-

mare che i germi così trattati non perdono la loro agglutinabilità specifica e che inoltre con l'uso di emulsioni così preparate si ha il vantaggio di poter leggere i risultati dopo un tempo minore.

Da 36 prove da me eseguite, risultano i seguenti fatti:

1.) I germi di culture fresche, tenuti per due ore a 60° non perdono la proprietà di essere agglutinati da sieri specifici.

2.) Gli stessi germi, nelle medesime condizioni, si comportano allo stesso modo delle emulsioni di fresco preparate di fronte ai sieri normali o di febbricitanti.

3.) Eguale comportamento posseggono le emulsioni batteriche preparate come sopra (Izar) e conservate in fialette sterili per più di un anno in ghiacciaia.

Questi risultati ci inducono a concludere che di fronte a un germe di agglutinabilità così variabile, l'uso di culture morte dovrebbe riuscire di grande utilità; poichè torna così facile prepararsi in una sola volta, quando si è in possesso di un ceppo ben provato, una forte quantità di emulsione, questa tecnica è atta a risparmiare il periodico controllo dell'agglutinabilità non specifica del ceppo in uso.

Infatti dalle esperienze del Lotti risulta che nei successivi passaggi sui comuni terreni di cultura il micrococco di Bruce perde la sua agglutinabilità specifica, e ancora, per partecipazione orale del Dott. Izar, che le culture in terreno glucosato si comportano diversamente di fronte ai sieri normali delle culture su agar comune, cioè le prime sono più facilmente agglutinabili.

V. Paramelitense. — Le prime notizie sull'esistenza di batteri analoghi per caratteri culturali e microscopici al micrococco di Bruce, ma differenziantisi da questo per le loro proprietà specifiche

di fronte ai sieri immuni ci furono forniti da Nègre e Raynaud.

Questi autori infatti studiando parallelamente sei ceppi di micrococco melitense hanno visto che uno fra questi si differenziava totalmente dagli altri cinque per il modo di comportarsi in presenza di sieri di malati affetti da infezione melitense e di sieri di conigli resi immuni mediante inoculazione di germi degli altri cinque stipiti.

Nègre e Raynaud inoltre poterono stabilire col metodo dell'assorbimento delle agglutinine di Castellani che animali immunizzati contro questo ceppo Br. possedevano agglutinine specifiche solo per esso, mentre il siero di animali immunizzati con gli altri cinque ceppi non agglutinava, dopo saturazione delle agglutinine specifiche, il ceppo Br.

Su questi dati gli autori crearono una nuova famiglia del ceppo melitense e la denominarono paramelitense, per analogia al comportamento e ai caratteri morfologici che i bacilli paratifici, paracolici ecc. offrono coi bacilli tifici, colici ecc.

Per cortesia del prof. Nicolle sono venuto in possesso di una cultura di paramelitense. (Il prof. Nicolle non indica se questa cultura derivi dal ceppo Br. o da altro ceppo da lui ulteriormente isolato).

Ho cimentato questo ceppo di fronte a 25 sieri di individui normali, a 92 sieri di febbricitanti e a 6 di individui affetti da infezione melitense (a sierodiagnosi positiva) ed ho constatato che tale germe si lasciava facilmente agglutinare da tutti i sieri esaminati e in diluizioni abbastanza forti (1:100, 200, 400); non ho potuto mettere in rilievo differenze notevoli di agglutinabilità di fronte a sieri normali e a sieri di individui affetti da infezione melitense. Sotto questo aspetto i caratteri di questo ceppo parasi avvicinano a quelli del mio ceppo Tr.

Conclusioni.—Da quanto son venuto esponendo risulta che il valore pratico della siero-diagnosi di Wright non può considerarsi infirmato dalle recenti ricerche.

Queste forniscono soltanto nuovamente la prova che nella esecuzione di tale reazione bisogna circondarsi di determinate cautele: guardarsi cioè da ceppi, del resto raramente occorrenti, i quali, forse a seguito di potratti passaggi su terreni artificiali, sono estremamente facili ad essere agglutinati anche da sieri non specifici.

Allorquando ci si sia assicurati della normale agglutinabilità del ceppo impiegato i reperti forniti dalla siero-diagnosi di Wright sono pienamente attendibili, e probativi in senso affermativo dalla diluizione di 1:100 in su.

Il riscaldamento preventivo per mezz' ora a 56° del siero in esame è superfluo.

In luogo delle culture viventi possono essere utilmente impiegate sospensioni di culture uccise (Izar).

BIBLIOGRAFIA.

Nègre. Sur l' agglutination du micrococcus melitensis par les sérums normaux. *C. R. S. Biolog.*, num. 37, 1910.— Nègre e Raynaud. Sur l' agglutination des microbes immobiles par le sérums normaux. *Annales Inst. Pasteur*, num. 8, 1911. *Ibidem.* Sur l' agglutination du microccus melitensis par les sérums humains. *C. R. S. Biolog.*, num. 12, 1911. *Ibidem.* Sur les relations qui existent entre le pouvoir antitryptique et le pouvoir agglutinant, non specifique vis a vis du M. M. des sérums humains. *C. R. S. Biolog.*, num. 7, 1912. *Ibidem.* Etude de l' agglutinabilité de differentès races de M. M. *C. R. S. Biolog.*, num. 15, 1912.— Saissawa. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionkrankeiten*, 28, XII, 1911. — Anglada. Recherches sur la S. R. de Wright. *C. R. S. Biolg.*, num. 9, 1912. *Ibidem.* Recherches de quelques conditions das lesquelles peut se produire en clinique la séro-agglutination du M. M. *Gazette des*

Hôpitaux, num. 44, 1912. — Carrieu et Anglada. *Presse Méd.* num. 90, 1912. — Lotti. Sul valore diagnostico della S. R. di Wright. *Rivista critica di Clinica medica*, num. 24, 1912. — Nicolle et Conor. Sul valore siero-diagnostico della S. R. di Wright. *Archiv de l'Institut Pasteur de Tunis*, III, 1912. — Rouslacroix. Le séro de Wright conserve sa valeur diagnostique. *Gazette des Hôp.* num. 31, 1912. — Menini. Alcune osservazioni intorno al fenomeno dell' agglutinazione del M. M. *Sperimentale*, vol. V, num. 6, 1911. — Manceaux. Sur l' agglutination du M. M. *C. R. S. Biolg.*, num. 17, 1912.— Vallet et L. Rimbaud. Etude experimentale de l'agglutination du M. M. *C. R. S. Biolg.* num. 7, 1913. — Danlos, Wurtz et Tanon. Deux cas de fiévre de Malte observés aux environs de Paris. *Soc. Med. des Hôpitaux*, num. 37, 1908. — Manquant et Pégurier. Fiévre de Malte avec contrôle bactériologique. *B. M. d. Soc. des Hôp. des Paris*, num. 10, 1909. — Goujet, Agasse-Laffont et Weill. Un nouveau cas de fiévre de Malte contracté en France et observé a Paris. *B. M. d. Soc. des Hôp. de Paris*, num. 38, 1909. — E. Weill et P. Menard. Un cas sporadique de fiévre de Malte *B. M. d. Soc. des Hôp. de Paris*, num. 17, 1912. — Lucibelli. Contributo allo studio di infezione sperimentale di M. M. *Rif. med.*, num. 2, 1909. — Evangelista. Sul potere agglutinante del siero di tubercolosi sul M. M. *Ibidem*, num. 4, 1909.— G. Izar. Contributo alla conoscenza della melitococcia. *Biochimica e terapia sperimentale*, fasc. V, 1911. — Ronchése. Sur le séro-diagnostic de la melitococcie avec des cultures tuées par le formol. *C. R. S. Biolg.* num. 5, 1913.— Nègre et Raynaud. Identification des paramelitensis par l' épreuve da la saturation des agglutinines *C. R. S. Biolg.*, num. 25, 1912. — Euziere et Roger. Le séro diagnostique de Wright a-t il une valeur diagnostique. *Gaz. d. Hôp.*, num. 21, 1912. — Guillain G. et Troisier J. Un cas de fiévre de Malte a Paris. *C. R. S. Biolog.*, num. 35, 1909. — Mazure. La fievre de Malte en Picardie. *Soc. Med. des Hôp. de Paris*, num 20, 1910.